

Instituto Superior de Agronomia

Relatório final de estágio de introdução à investigação:

**Caracterização dos grãos de pólen e estigmas de
Limonium multiflorum Erben e *Limonium ovalifolium* (Poiret) O. Kuntze.**

Sérgio Filipe Murra Martins

Orientadora: Doutora Ana Caperta
Co-orientadora: Doutora Generosa Teixeira

Lisboa, 2011

Índice:

Sumário.....	3
1. Introdução.....	4
2. Objectivos.....	6
3. Materiais e Métodos.....	7
3.1) Obtenção de plantas e cultura de plantas.....	7
3.2) Análise da morfologia polínica e superfícies estigmáticas.....	7
3.2.1 Fixação e preparação do material vegetal.....	7
3.2.1 Microscopia electrónica de varrimento.....	8
4. Resultados.....	8
5. Discussão.....	14
Bibliografia e Webgrafia.....	16
Anexo I.....	17

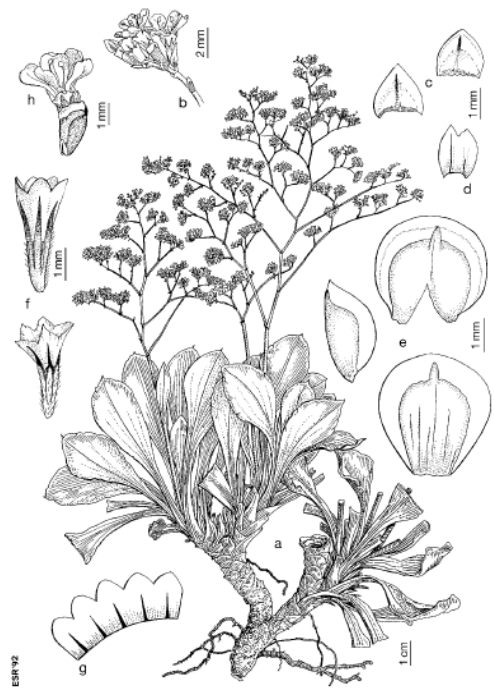
Sumário:

No presente trabalho foram estudados os grãos de pólen e os estigmas de diferentes indivíduos de distintas populações da espécie *Limonium ovalifolium* (Poiret) O. Kuntze e do endemismo lusitano *Limonium multiflorum* Erben que ocorrem em arribas costeiras do litoral português. Através da análise de microfotografias obtidas por microscopia electrónica de varrimento caracterizou-se a morfologia polínica, nomeadamente a forma, tipo de ornamentação e dimensão dos grãos de pólen e as superfícies estigmáticas. Em ambas as espécies foram identificados dois tipos de superfícies estigmáticas, tipo "maçaroca de milho" (*cob-like*) e tipo "papilosa" (*pap*), anteriormente descritas para o género *Limonium*. Relativamente aos indivíduos das populações de *L. ovalifolium*, observaram-se dois tipos polínicos descritos para o género *Limonium*, grãos com ornamentação tipo reticulada de malha larga (pólen *A-type*) ou grãos com ornamentação tipo reticulada malha estreita (pólen *B-type*), embora numa das populações fossem detectados ambos os tipos polínicos, ambos de forma circular. De acordo com classes de dimensões estabelecidas, estes grãos de pólen foram classificados de "médios" e "grandes". Em contraste, nas populações de *L. multiflorum*, diferentes tipos de grãos de pólen foram determinados variando na sua forma, tipo de ornamentação e dimensões, não tendo sido possível encontrar um padrão. Os tipos de ornamentações dos grãos de pólen observados não correspondem a nenhum dos identificados para as espécies do género *Limonium*. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem diferentes sistemas de cruzamento nas populações de *L. ovalifolium* e *L. multiflorum*.

Palavras-chave: *Limonium*, morfologia polínica, microscopia electrónica de varrimento(MEV).

1.Introdução

O género *Limonium* Miller, pertencente à família *Plumbaginacea*, que possui cerca de 400 espécies (Erben, 1993), distribuídas pela Europa, Ásia, África, Austrália e América do Norte. A maior diversidade encontra-se desde as ilhas Canárias até à Ásia Central, passando pela região mediterrânica. São geralmente plantas perenes, existindo algumas anuais. Possuem folhas simples, em rosetas basais mas por vezes também em ramos densamente folhosos. As inflorescências podem ser paniculadas ou corimbosas, que ocasionalmente são estéreis, cada uma provida na base de uma bráctea avermelhada. Os cincinnos são de pseudo-espiguetas 1-5 floras, 3-bracteadas com a bráctea interna e externa do lado de fora da pseudo-espiguetas. As flores apresentam cálice afunilado, de limbo escarioso, geralmente corado, por vezes denticulado entre os lobos. A corola é tubular, ou de pétalas só concrecentes na base. Os estames em número de 5 estão inseridos apenas



Lám. 31.-*Limonium ovalifolium*, Chiclana de la Frontera, Cádiz, (herb. Erben): a) hábito; b) porción apical de una ramilla de la inflorescencia; c) bráctea externa; d) bráctea media; e) bráctea interna; f) cáliz; g) limbo del cáliz extendido; h) flor.

Figura 1: ilustração de *Limonium ovalifolium* (Erben, 1993)



Figura 2: *Limonium multiflorum* no Cabo Raso.

na base da corola e os estiletes em número de 5, glabros, podem ser livres ou concrecentes na base, sendo os estigmas filiformes. O fruto consiste numa pequena cápsula com uma única semente, parcialmente envolta pelo cálice persistente. Em Portugal existem cerca de 19 espécies distribuídas em sapais e arribas litorais, de que são exemplo *Limonium multiflorum* e *L. ovalifolium* descritas em anexo. As espécies de *Limonium* cruzam frequentemente entre si formando híbridos (Erben, 1993).

Nas Angiospérmicas a flor é constituída pelo cálice e corola, o conjunto de sépalas e pétalas e

conjunto de estames e carpelo, respectivamente. O carpelo encerra na base do ovário um ou mais óvulos e mais acima o estilete que possui na extremidade o estigma, superfície que receberá os grãos de pólen. Os estigmas de cada espécie estão adaptados a receber o respectivo grão de pólen. Existe um reconhecimento que é feito quer ao nível físico, por diferentes ornamentações da malha de exina, quer químico através de compostos que estimulam ou inibem a formação do tubo polínico. Nos estames, a antera é dividida em dois lóbulos onde cada um contém dois sacos polínicos ou microsporângios. Os microsporângios são inicialmente constituídos por uma massa uniforme de células, diferenciando-se posteriormente em microsporócitos e estes através de divisão meiótica em micrósporos (microsporogénese). Os micrósporos ou grãos de pólen possuem duas células, uma célula vegetativa e outra germinativa. O micrósporo se foi reconhecido na superfície estigmática, inicia-se a formação do tubo polínico com origem na célula vegetativa, ocorrendo nessa fase uma divisão mitótica da célula germinativa. Através do tubo polínico as duas células germinativas penetram no óvulo fundindo-se uma com a oosfera e formando o ovo ou zigoto, e a outra une-se com os dois núcleos polares formando o endosperma (dupla fecundação).

O grão de pólen varia muito conforme a espécie em termos de polaridade, forma, ornamentação, dimensão, entre muitos outros aspectos. Na caracterização de um grão de pólen considera-se a existência de dois pólos, o pólo distal e o proximal. A linha imaginária que une os dois pólos é chamada de eixo polar. Existe ainda outro eixo que passa pela zona equatorial e é perpendicular ao eixo polar. Estes eixos são úteis para a determinação da forma do grão, através da razão entre o eixo polar e o equatorial (Erdtman, 1952; Valdes *et al.*, 1987; Sawyer, 1998 *in* Teixeira & Branco, 2006). A forma do grão de pólen pode ser também entendida como o contorno do grão variando conforme a perspectiva pela qual observamos o grão de pólen. Na perspectiva equatorial a forma pode ser considerada rectangular, rômica, circular e elíptica. Na perspectiva polar a forma pode ser considerada triangular, quadrangular, pentagonal, circular e elíptica (Reitsma, 1970 *in* Teixeira & Branco, 2006). A sua dimensão é muito variável, entre 10 μm e 200 μm . De acordo com as dimensões dos grãos de pólen estes podem ser classificados de muito pequenos (<10 μm), pequenos (10 μm -24 μm), médios (25 μm -49 μm), grandes (50 μm -100 μm), muito grandes (101 μm -200 μm) e gigantesco (>200 μm) (Erdtman *in* Teixeira & Branco, 2006). A ornamentação no grão de pólen é definida pela camada externa a que se dá o nome de exina. A exina é constituída em grande parte por esporopolenina, um composto muito complexo e extraordinariamente estável e resistente constituído por polímeros de carotenóides e ésteres de carotenóides (Martin & Juniper, 1970; Iwanami *et al.*, 1988; Raven *et al.*, 1999; Raven *et al.*, 2005 *in* Teixeira & Branco, 2006). A exina possui duas camadas: a nexina e a sexina sendo uma interior e outra exterior, respectivamente. É esta camada exterior que apresenta ornamentações e padrões que geralmente variam de espécie para espécie e que são muito importantes na caracterização das mesmas. Essas ornamentações são muito variadas e por

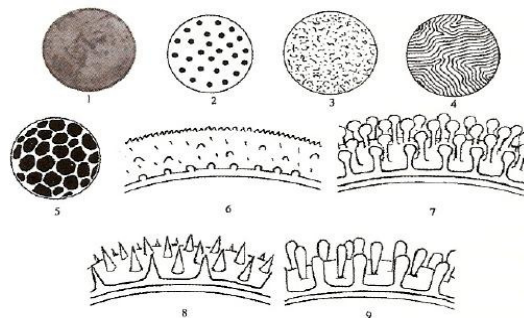


Figura 3.4 Diferentes padrões de ornamentação da exina: 1 plano ou liso; 2 perfurado; 3 rugulado ou cerebróide; 4 estriado; 5 reticulado ou rendilhado; 6 verrugoso; 7 pilado; 8 equinóide ou equinado; 9 baculiforme ou claviforme. (Adaptado de Sawyer, 1988; Iwanami *et al.* 1988).

Figura 3: Diferentes padrões de ornamentação da exina (Adaptado de Sawyer, 1998; Iwanami *et al.* 1998 in Teixeira & Branco, 2006)
vezes são difíceis de avaliar de modo objectivo e analítico.

A ocorrência de dimorfismos florais no género *Limonium*, tal como nas Plumbagináceas de uma forma geral está bem documentada, exibindo o género *Limonium* tanto dimorfismo polínico com estigmático, tendo associado um mecanismo de auto-incompatibilidade esporofítica (Baker 1948, 1958 ; García *et al.*,2009). Em diversas espécies de *Limonium* foram identificados dois tipos de estigmas, um com superfície estigmática em forma de “maçaroca de milho” (*cob-like*) e o outro tipo, papiloso (*pap*) (Baker, 1966). Foram também descritos dois tipos de pólen, com um padrão de ornamentação tipo reticulado, diferindo no tamanho da malha (A-pollen and B-pollen). As flores possuem estigmas maçaroca (Figura 4, C) e pólen de malha reticulada larga (Figura 4, B) ou apresentam estigma papiloso (Figura 4, F) e pólen de malha reticulada estreita (Figura 4, E) são autoestéreis e as outras são autoférteis (Baker, 1953; García *et al.*,2009).

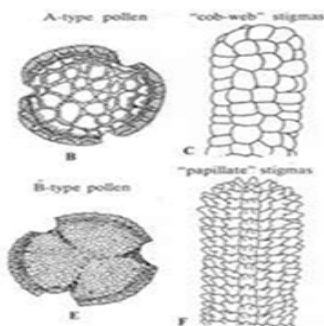


Figura 4: Diferentes combinações estigma-pólen para *Limonium vulgare* (adaptado de Baker 1966)

2. Objectivos

O presente trabalho teve como objectivos caracterizar os grãos de pólen e estigmas apresentados por indivíduos de diferentes populações de *L. multiflorum* e *L. ovalifolium*.

3. Materiais e Métodos

3.1 - Obtenção de plantas e cultura de plantas

As espécies estudadas foram *Limonium ovalifolium*, usando representantes de três populações: Cabo Raso (Cascais), Cabo de Sagres (Sagres) e Praia da Luz (Lagos); e *Limonium multiflorum*, usando indivíduos de duas populações, Cabo Raso (Cascais), Vale de Frades (Lourinhã).

As sementes foram obtidas de recolhas efectuadas no campo. Dado que as sementes encontram-se envoltas pelo cálice e corola secas, para remover as mesmas foram utilizadas duas placas de cortiça, entre as quais foram abradidas as sementes. Os fragmentos das pétalas e sépalas foram posteriormente crivados de modo a separá-los das sementes. A obtenção de plantas foi feita através da sementeira com as sementes previamente limpas. Para isso foi utilizado substrato para plantas esterilizado, que foi colocado em pequenos vasos.

Para proceder à sua germinação, os vasos foram colocados numa estufa com temperatura controlada variando entre os 18°C e 22°C com um fotoperíodo de 8 horas.

3.2- Análise da morfologia polínica e estigmas

3.2.1 Fixação e preparação do material vegetal

As flores utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir de plantas, em cultura nas estufas do Instituto Superior de Agronomia ou de plantas herborizadas (Herbário João de Carvalho e Vasconcelos, LISI).

As flores de ambas as espécies foram fixadas numa solução aquosa (p/v) 2,5% glutaraldeído durante 3 horas a 4°C. Em seguida foram realizadas lavagens num tampão fosfato (1xPBS), mantendo-se posteriormente neste tampão durante 24 horas a 4°C. Depois, foram realizadas lavagens em água destilada, 3 vezes durante 30 minutos cada. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em soluções aquosas ascendentes (p/v) 30%, 50%, 70% e por fim a 95% de etanol, onde foram guardadas a 4°C. As amostras foram mantidas 30 minutos a 1 hora em cada uma das soluções. A secagem foi realizada através do método de ponto crítico do CO₂, efectuada num aparelho Critical Point Polaron BioRad E3500. Após o ponto crítico, procedeu-se à montagem em suportes metálicos cobertos com fita adesiva dupla. No processo de montagem, as flores foram previamente observadas à lupa, removendo-se as brácteas, também as pétalas e sépalas. Dessa forma isolou-se o conjunto de estames e estigmas e a montagem incluía apenas estes. As anteras foram ligeiramente pressionadas de forma a abrirem e libertarem o pólen e como forma de fixar os grãos na fita adesiva, tal como o restante material da amostra. A metalização ocorreu por irradiação com ouro num metalizador Jeol JFC-1200.

3.2.2 Microscopia Electrónica de Varrimento (MEV)

As observações foram realizadas num aparelho da marca Jeol, JSM-5220 LV, a 15 Kv e a 25 Kv, utilizando um sistema de aquisição directa de imagem.

O estudo da morfologia polínica foi realizado com base em microfotografias obtidas por MEV onde se observou a sua ornamentação. Para as medições os grãos de pólen foram medidos com uma régua sobre a imagem e essa medição convertida em micrómetros (μm) com base na escala da microfotografia medida. Na observação de estigmas atendeu-se apenas ao seu tipo.

As amostras medidas variam entre populações. Para *L. ovalifolium* mediu-se um número maior de grãos, (entre 28 e 71 medições), num total de 143 medições. Em *L. multiflorum*, e apesar de ter sido feito um esforço de amostragem maior, o número de grãos medidos foi inferior variando entre 22 e 27 medições num total de 49 medições. Nos estigmas, apenas se observou 1-2 por flor amostrada, visto que os seus 5 estigmas pertencem sempre ao mesmo tipo. Isto leva a que o valor da amostra seja muito reduzido, variando entre 3 e 8 amostras, num total de 25.

Os valores medidos foram inseridos numa folha de cálculo de um ficheiro excel de modo a analisar os dados, organizando-os por populações, calculando médias, desvios e erros padrão e elaborando gráficos e tabelas de modo a melhor interpretar os dados observados.

4. Resultados

O método usado na limpeza de sementes mostrou-se eficaz, permitindo obter as plantas necessárias para estudo.

A análise das microfotografias obtidas permitiu determinar os tipos de estigmas, ornamentação dos grãos de pólen, a sua forma e dimensão. Os estigmas observados corresponderam ao que já havia sido descrito para o género (Baker 1966; Erben, 1978). Tanto em *L. ovalifolium* como em *L. multiflorum* foram observados estigmas do tipo maçaroca (Figura 5A e Figura 6A) e do tipo papiloso (Figura 5B e Figura 6B), como apresentado na tabela 1.

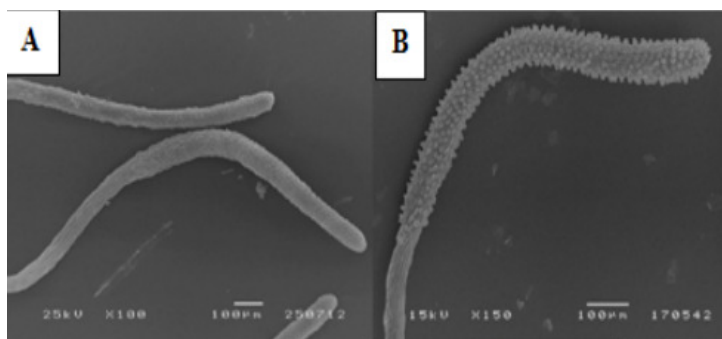


Figura 5: *L. multiflorum* Vale de Frades e Praia dos Coxos, respectivamente, mostrando estigmas de tipo maçaroca (A) e papiloso (B).

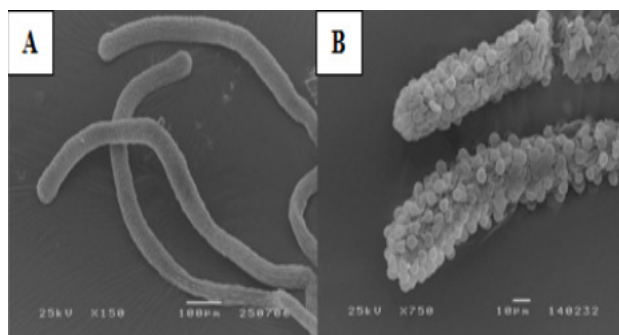


Figura 6: Estigmas de *L. ovalifolium* das populações Praia da Luz e Cabo Sagres respectivamente mostrando estigma do tipo maçaroca (A) e papiloso (B).

Em relação aos grãos de pólen, em termos de forma, em *L. ovalifolium* observou-se que quer da perspectiva polar (Figura 7A), quer da perspectiva equatorial (Figura 7B) esta era circular ou ligeiramente elíptica. Em *L. multiflorum* foi difícil determinar a perspectiva do grão na microfotografia, no entanto em alguns grãos apresentavam ser também circulares em ambas as perspectivas (Figura 9D).

Em termos da ornamentação dos grãos de pólen, observou-se que em geral em *L. ovalifolium* o tipo de padrão é tipo de padrão reticulado com o tamanho de malha a ser larga em todas as populações estudadas (Figura 7 B e 8 B), excepto Cabo Sagres onde se observou os dois tipos de malha (Figura 8 A), larga e estreita respectivamente. No caso de *L. multiflorum* os grãos de pólen apresentaram diferentes ornamentações entre as populações nunca tendo sido observado o tipo de ornamentação descrito para o género *Limonium* (Baker 1966, Erben, 1978) (Figura 9). Na amostra do Cabo Raso os grãos de pólen tinham variáveis apresentando padrões de ornamentação de exina muito variáveis: plano, verrucoso e perfurado (Figura 9C e 9D) . Na amostra de Vale de Frades o padrão de ornamentação de exina era do tipo perfurado.

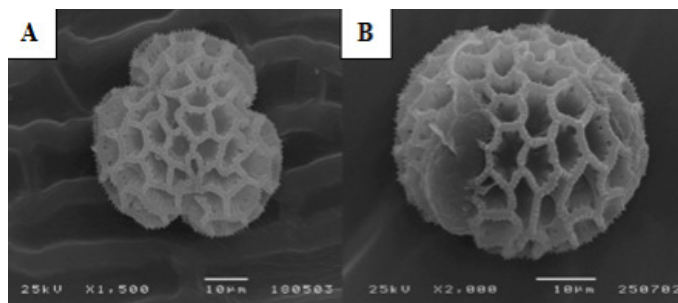


Figura 7: Grão de pólen de *L. ovalifolium*.: A :perspectiva polar; B: perspectiva equatorial

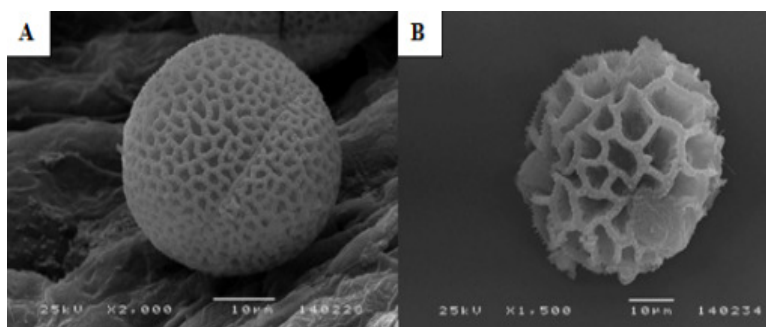


Figura 8: Grão de pólen de *L. ovalifolium* população Cabo Sagres apresentado os dois tipos de malha reticulada, A: estreita; B: larga.

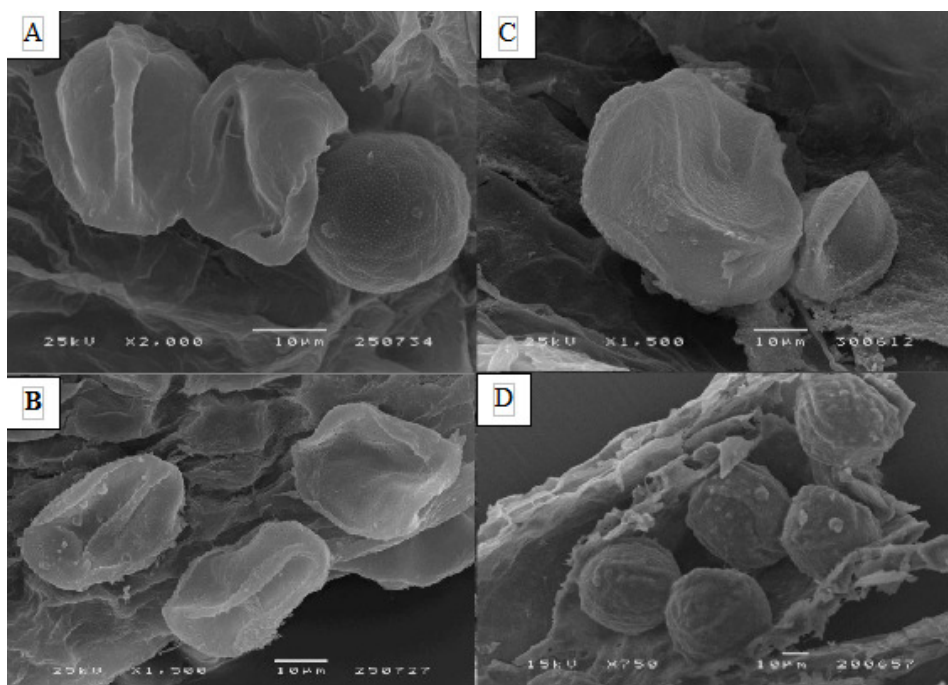


Figura 9: microfotografias de *L. multiflorum* Vale Frades (A e B) e Cabo Raso (C e D) respectivamente, mostrando uma grande variabilidade de ornamentações e dimensões.

Os grãos de pólen foram ainda classificados relativamente á sua dimensão (μm) segundo a classificação de Erdtman (1966) (Erdtman *in* Teixeira & Branco, 2006), mostrando a tabela 1, a sua distribuição pelas diferentes classes. A dimensão média de cada população dentro de cada espécie é relativamente constante verificando-se no entanto que os grãos de pólen em *L. ovalifolium* são em média maiores que os de *L. multiflorum* (gráfico 1 e 2).

Tabela 1: Média das dimensões de grãos de pólen por população de cada espécie estudada e respectivo erro padrão e tipos de estigmas. Nos estigmas apenas foi avaliado a presença ou não nas amostras do tipo de estigma.

Grãos de pólen										Estigmas	
Espécie	Média	erro padrao	classes				n	malha		Tipo de estigma	
			muito pequeno	pequeno	médio	grande		estreita	larga	maçaroca	papiloso
			<10	10>x<24	25>x<49	50<x<100					
L. ovalifolium Cabo raso	46,79	0,22	0,00	0,00	0,86	0,14	44,00		x	X	X
L. ovalifolium Cabo Sagres	42,69	0,22	0,00	0,00	0,92	0,08	71,00	x	x		X
L. ovalifolium praia da luz	42,59	0,12	0,00	0,00	0,82	0,18	28,00		x	X	
			muito pequeno	pequeno	médio	grande					
			<10	10>x<24	25>x<49	50<x<100					
L. multiflorum vale de frades	28,86	0,10	0,00	0,18	0,82	0,00	22,00	Ñ aplicavel	Ñ aplicavel	X	
L. multiflorum Cabo Raso	30,74	0,54	0,07	0,30	0,59	0,04	27,00	Ñ aplicavel	Ñ aplicavel	X	X
							225,00				

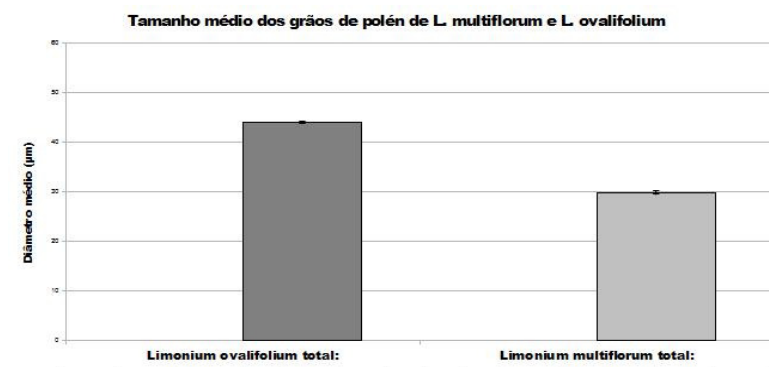


Gráfico 1: Dimensão média dos grãos de pólen de *L. ovalifolium* e *L. multiflorum*.

Ao nível das populações existem pequenas variações das dimensões em ambas as espécies. Em *L. multiflorum* população Cabo Raso observa-se no entanto um erro padrão maior e por isso uma maior variação em termos de dimensões de grão de pólen em relação à população de Vale de Frades. Verificou-se ainda que a maioria dos grãos de pólen de *L. ovalifolium* se encontrava na classe de dimensão entre os 25 e 49 µm, correspondente à classe de dimensão “média”, ficando os restantes na classe de dimensão “grande” (50-100µm) (Gráfico 3).

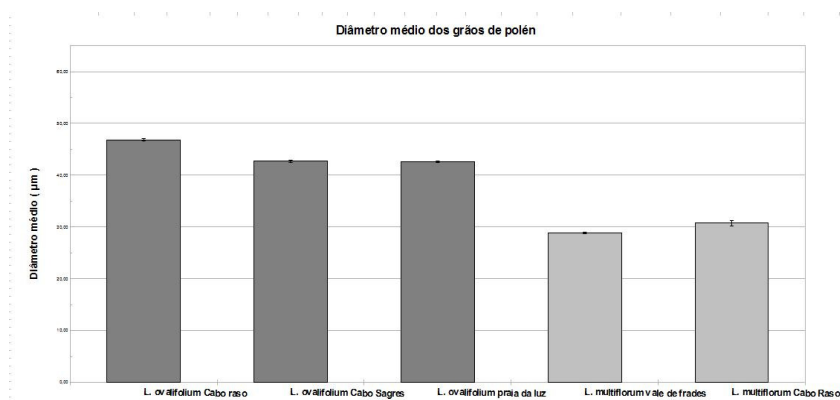


Gráfico 2: Dimensão média dos grãos de pólen em diferentes populações de *L. ovalifolium* e *L. multiflorum*.

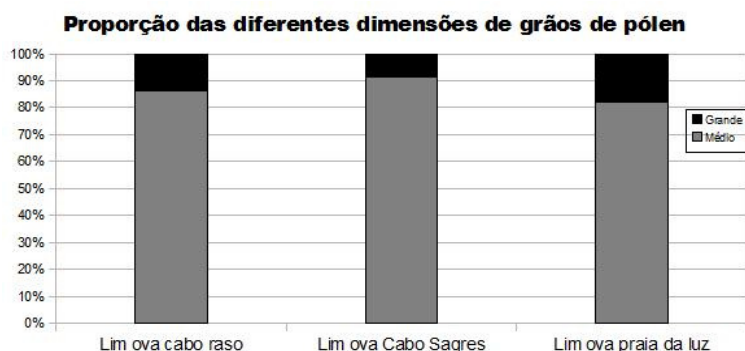


Gráfico 3: Proporção dos diferentes classe de dimensões dos grãos de pólen em *L. ovalifolium*.

Relativamente a *L. multiflorum*, na população de Vale de Frades a maioria dos grãos de pólen (82%) encontram-se na classe de dimensão “médio”, incluindo-se os restantes na classe “pequeno” (gráfico 4). Na população do Cabo Raso, a maioria dos grãos encontrava-se na classe de dimensão “pequeno” e “médio” com uma percentagem de 30% e de 59% respectivamente. A restante amostra encontrava-se distribuída nas classes de dimensão “muito pequeno” e “grande” com 7% e 4% respectivamente.

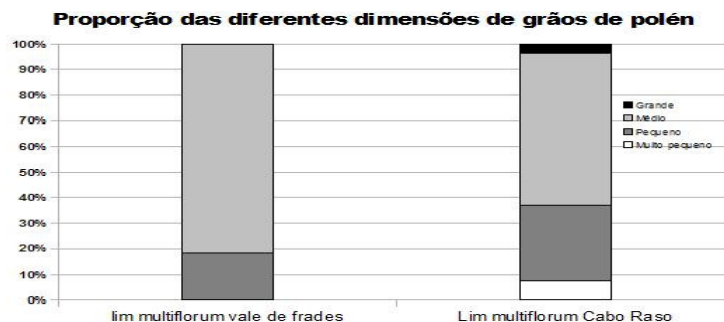


Gráfico 4: Proporção dos diferentes classes de dimensões dos grãos de pólen em *L. multiflorum*.

Para averiguar se existia variação no tamanho dos grãos de pólen provenientes de uma mesma antera, foram medidos os grãos de pólen que se encontravam dentro das anteras, garantindo dessa forma que os grãos de pólen medidos eram provenientes da mesma antera. Tal estimativa apenas foi possível para *L. ovalifolium* nas populações Cabo Raso e Cabo Sagres e em *L. multiflorum* população Cabo Raso. De realçar que o número amostral de grãos de pólen foi muito pequeno sendo de 31, 5 e 8 respectivamente para as diferentes espécies e populações. As 3 espécies/populações estudadas apresentam valores por antera que correspondentes às médias gerais dos grãos de pólen.

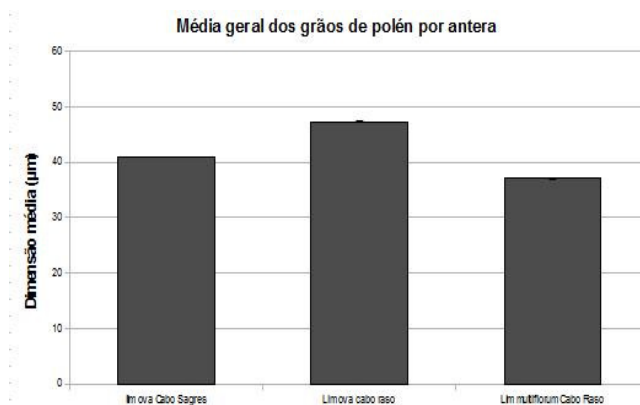


Gráfico 5: Média geral dos grãos de pólen por antera de *L. ovalifolium* nas populações Cabo Raso e Cabo Sagres, e em *L. multiflorum* na população Cabo Raso.

As medições dos grãos de pólen por antera também foram distribuídos pelas diferentes classes de dimensão. No gráfico 6 pode-se observar que à excepção de *L. ovalifolium* população Cabo Raso em que existiam grãos classificados quer no grupo grande (60%) quer no grupo médio (40%), no caso de *L. ovalifolium* Cabo Sagres e *L. multiflorum* Cabo Raso, as anteras analisadas apenas exibiam grãos da classe “médio”.

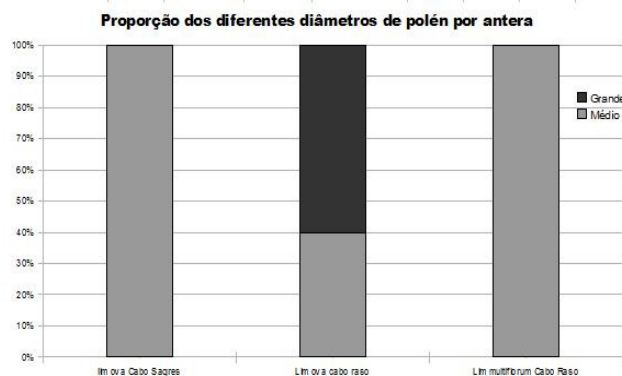


Gráfico 6: Proporção das diferentes classes de dimensão de grãos de pólen por antera em *Limonium* sp.

5. Discussão

Neste trabalho foi efectuada uma análise aos grãos de pólen de *L. ovalifolium* e *L. multiflorum*, provenientes de vários locais do litoral de Portugal Continental. Os resultados obtidos permitiram caracterizar os grãos de pólen e estigmas destas espécies e suas populações, tendo-se encontrado grandes diferenças entre elas.

Os tipos de estigmas observados foram os dois conhecidos do género, ou seja, o tipo maçaroca de milho e o tipo papiloso. Ambos os tipos foram observados nas duas espécies em populações diferentes. No entanto, e tendo em conta o tamanho da amostra analisada não se fez qualquer relação entre os dados e diferentes populações.

A presença de grãos de pólen com malha estreita apenas foi observada em *L. ovalifolium* na população de Cabo de Sagres. Todas as outras populações de *L. ovalifolium* apresentam grãos de pólen com malha de exina reticulada larga. Em *L. multiflorum* população Cabo Raso não foi observado nenhum tipo de ornamentação padrão, sendo os grãos de pólen caracterizados por uma forma e ornamentação muito variável. Nesses tipos de ornamentação encontramos ornamentação do tipo: plano, verrucoso e perfurado. Na amostra de Vale de Frades o padrão de ornamentação de exina era do tipo perfurado.

Os grãos de pólen de *L. ovalifolium* apresentam nas 3 populações analisadas uma dimensão média de 44,02µm enquanto que *L. multiflorum* a média das 2 populações é de 28,9µm. De

notar que na espécie *L. ovalifolium* a amostra consiste em 143 medições num total de 3 populações e em *L. multiflorum* em 49 medições em 2 populações diferentes. Apesar disso a diferença nas dimensões de grãos de pólen são relevantes de modo a distinguir as duas espécies. Quando se considerou a distribuição dos grãos de pólen por classes de dimensão estabelecidas por Erdtman (*in* Teixeira & Branco, 2006), verifica-se que em *L. ovalifolium* ocorrem grãos de pólen de dimensão “médio” na maioria dos casos, com uma pequena percentagem de grãos de dimensão “grande”. Relativamente a *L. multiflorum* existem grandes diferenças nas suas dimensões relativas. Por exemplo na população do Cabo Raso, como já havia sido constatado no erro padrão, também as dimensões são muito variáveis dentro das classes de dimensão, com a maioria dos grãos de pólen de dimensões entre “pequeno” e “médio”, existindo no entanto quer grãos de pólen na dimensão “grande” como “muito pequeno”. Na população de Vale de Frades as dimensões são mais constantes e isso reflete-se nas classes de dimensão, estando a maioria dos grãos na classe de dimensão “média”.

Tendo em conta a variação observada nas dimensões dos grãos de pólen, especialmente para a população de Cabo Raso, temos a hipótese de que as classes estabelecidas por Erdtman (1952) não sejam as mais indicadas de forma a melhor classificar a amostra de *Limonium* estudadas, dada a sua grande variabilidade dentro de cada amostra.

Relativamente às dimensões dos grãos de pólen pertencentes à mesma antera, observa-se que de uma forma geral a média por antera correspondente à média daquela população. No entanto, em *L. multiflorum* Cabo Raso onde a média por antera (37,2µm) é um pouco superior à da amostra total (29,8µm). Os grãos de pólen de *L. ovalifolium* Cabo Sagres e *L. multiflorum* Cabo Raso são apenas de dimensão média, enquanto *L. ovalifolium* Cabo Raso apresenta grãos de pólen de dimensão “grande” e “média”. De referir que dada a dificuldade em medir grãos de pólen na mesma antera, em *L. ovalifolium* Cabo Raso e *L. multiflorum* Cabo Raso apenas são amostrados 5 e 8 grãos de pólen respectivamente. A variabilidade de dimensão em alguns grãos de pólen pode indicar grãos de pólen reduzidos e não reduzidos.

Analisando quer os dados dos diferentes tipos de malha reticulada e estigmas, observa-se que tendo em conta a nossa amostra, nas populações de Cabo Raso e Cabo Sagres as plantas são autoestéreis e autointertéis. Na população da Praia da Luz observa-se apenas uma combinação autoestéril, o que pode indicar que a espécie apenas se reproduz de forma apómitica ou por hibridação com a outra espécie de *Limonium* presente no local, *L. virgatum*.

Em relação a *L. multiflorum* não se observou qualquer tipo de grãos de pólen com malha reticulada, tornando a combinação autoestéril. De notar que *L. multiflorum* produz semente viável e de forma abundante, sendo que o mais provável é que estas sejam produzidas por apomixia ou por cruzamento com outras espécies de *Limonium* presentes no local, existindo nestes locais quer *L. virgatum*, quer *L. ovalifolium*.

Neste trabalho encontrou-se algumas dificuldades na obtenção de grãos de pólen viáveis para

medições em ambos os planos equatorial e polar, e dessa forma algumas das medições podem não ser o mais correctas e precisas. Isto acontece mais com as amostras do *L. multiflorum* comparativamente com *L. ovalifolium*.

Tendo em conta a grande variabilidade em *L. multiflorum* e os diferentes tipos de pólen observados, novos estudos são necessários de modo a se compreender melhor os mecanismos de reprodução da espécie. Outro aspecto que importa avaliar é se estes grãos de pólen são viáveis e não apenas grãos de pólen imaturos ou danificados, apesar das flores estarem maduras.

Bibliografia

AMARAL FRANCO, J.(1984) Nova Flora de Portugal [vol 2]. Lisboa.

BAKER, H. G. 1948. Dimorphism and monomorphism in the Plumbaginaceae I: A survey of the family. – Ann. Bot. 12: 207–219.

BAKER, H. G. 1953. Dimorphism and monomorphism in the Plumbaginaceae II: Pollen and stigma in genus *Limonium*. – Ann. Bot. 17: 433– 455.

BAKER, H. G. 1966: The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility system. 1. The family Plumbaginaceae. – Evolution 20(3): 349–368.

BRIAN P. HERMANN, TARUN K. MAL, RUSSELL J. WILLIAMS, AND NORMAN R. DOLLAHON, 1999, Quantitative Evaluation of stigma polymorphism in a tristylous weed, *Lythrum salicaria* (LYTHRACEAE) American Journal of Botany 86(8): 1121–1129.

CAROLINA SUÁREZ-GARCÍA, JULIA PÉREZ DE PAZ, ROSA FEBLES, JULI CAUJAPÉ-CATELLS, 2009 Genetic diversity and floral dimorphism in *Limonium dendroides* (PLUMBAGINACEA), a woody Canarian species on the way of extinction, Plant Syst Evol (2009) 280:105–117 DOI 10.1007/s00606-009-0166-8.

DULBERGER, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. In S. C. H. Barrett [ed.], Evolution and function of heterostyly, Monographs on Theoretical and Applied Genetics, vol. 15, 41–84. Springer-Verlag, Berlin

ERBEN M. (1978). Die Gattung *Limonium* im südwestmediterranen Raum. Mitt. Bot. Staatssamml.Miunchen 14: 361-631.

ERBEN, M. (1993). *Limonium* Mill. In: CASTROVIEJO, C. AEDO, S. CIRUJANO, M. LAINZ, P. MOSERRAT, R. MORALES, F. MUNOZ GARMENDIA, C. NAVARRO, J. PAIVA & C. SORIANO. Flora Iberica 3: 2-143. Madrid.

ERDTMAN, G. 1952. Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. Almquist & Wiksells, Stockholm.

TEIXEIRA G.,BRANCO M. 2006. Pólen. Série Didáctica Botânica. MONTEIRO, A. & MOREIRA, I. (Eds.) ISAPress, Lisboa, 66 p. (ISBN 972-8669-22-4).

Webgrafia

http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=118606

http://en.wikipedia.org/wiki/Scanning_Electron_Microscope

http://www.icn.pt/psrn2000/caracterizacao_valores_naturais/flora/Limonium%20multiflorum.pdf

Anexo I:

Limonium multiflorum Erben é um endemismo lusitano, sendo uma espécie perene, crescendo em rosetas basais, folhas com 20-70 x 7-15mm, mais ou menos oblanceoladas e obtusas, verde-acinzentadas, com limbo oblanceolado a lanceolado, ápice agudo, pecíolo com 3-6mm largura, 1-5 nervuras. Inflorescência é do tipo A ou C, por vezes D, psedo-espiguetas que ramificam desde o terço superior, não possuindo ramos estéreis. As espiguetas de 9-12cm com 3-6 flores. A bráctea externa tem dimensões entre 2,8-3,8x2,7-3,6mm, a bráctea média 2,5-3,7x2,2-2,8mm e a bráctea interna 5-6x4-4,8mm e cálice entre 5,2-5,8mm. Ocorre nas arribas litorais calcárias do Oeste de Portugal Continental entre o Cabo Mondego e Cascais (Erben, 1993).

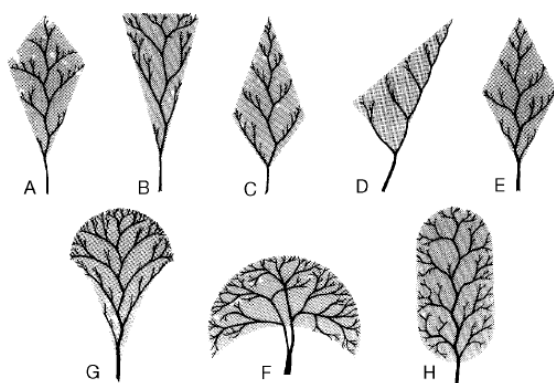


Figura 5 : Tipos de inflorescências no género *Limonium*.
(Adaptado de Erben, 1993)

Limonium ovalifolium (Poiret) O. Kuntze constitui uma planta perene, crescendo em rosetas basais, folhas com 15-80 x 8-25mm, mais ou menos plicadas na nervura central, de secção côncava com variação de 3-5 nervuras, elíptico-lanceoladas a obovadas, agudas mucronadas e glaucas. As inflorescências são do tipo C ou G, de ramificações obliquas, laxas, ralas, piramidais, de extremidades mais ou menos corimbiformes, sem ramificações estéreis, e as espigas têm 4-12mm, com 9-13 espiguetas com 3-8 flores. Flores 4-5 mm de diâmetro, cálice entre 3,4-4,1 mm. Ocorre desde a costa Algarvia ao Sudoeste Alentejano e no Oeste de Portugal Continental em arribas litorais, areias e em sapais (Erben, 1993).